



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA,  
BRASÍLIA-DF, BRASIL E NO LABORATÓRIO DE ANDROLOGIA ANIMAL -  
UFRPE, RECIFE-PE**

**COMPARAÇÃO ENTRE QUATRO PROTOCOLOS DE PREPARAÇÃO DO  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA ESPÉCIE EQUINA**

**GABRIELA REIS XAVIER**

**RECIFE, 2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**COMPARAÇÃO ENTRE QUATRO PROTOCOLOS DE PREPARAÇÃO DO  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA ESPÉCIE EQUINA**

**GABRIELA REIS XAVIER**

**Relatório de Estágio Supervisionado  
Obrigatório realizado como exigência  
parcial para a obtenção do grau de  
Bacharela em Medicina Veterinária, sob  
Orientação do Prof. Dr. Gustavo Ferrer  
Carneiro.**

**RECIFE, 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G118c

Xavier , Gabriela Reis

Comparação entre quatro protocolos de preparação do Plasma Rico em Plaquetas na espécie Equina / Gabriela Reis  
Xavier . - 2024.  
40 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer .  
Inclui referências e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em  
Medicina Veterinária, Recife, 2024.

1. Reprodução equina. 2. Fatores de Crescimento . 3. Terapia Celular. I. , Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**COMPARAÇÃO ENTRE QUATRO PROTOCOLOS DE PREPARAÇÃO DO  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA ESPÉCIE EQUINA**

Relatório elaborado por

**GABRIELA REIS XAVIER**

Aprovado em: 02/02/2024

**BANCA AVALIADORA**

---

**Profº Dr. Gustavo Ferrer Carneiro**

**Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE**

---

**MV Me. Antonio Brito da Silva Filho**

---

**MV. Giovanna Couto**

## AGRADECIMENTOS

Por todos os dias floresço na gratidão. Por todos os dias me faço de retalhos, momentos e pessoas. Por todos os dias faço o que é certo, e não o que é fácil. Por todos os dias ressignifico a vida, quem eu sou e para onde quero ir. Por todos os dias em que a oração é por sabedoria. Por todas as vezes em que os resultados não foram imediatos.

No mais breve clichê, inicio agradecendo a Deus, e não por motivos comuns. Agradeço a Deus por fazer da minha vida e do meu nascimento o encontro com minha alma gêmea, a minha mãe Viviane. Eu não posso agradecer a minha vida, sem agradecer a vida dela. Por tudo o que ela é, por tudo o que ela me fez ser e por tudo o que ela luta até hoje. Ela é o centro do meu mundo e meu divino é ter ela.

Estendo o meu clichê, ao encontro das minhas outras duas almas gêmeas, os meus irmãos, Rafa e Pedro. Eles são parte e finalizam o trio pelo qual luto todos os dias, por quem me transformo e pela vida que quero transformar. Sou por vocês e isso é por nós. Nesse combo, minha irmã Yasmin, que me apoia, me ajuda e me faz sentir o maior ser do mundo.

À minha Tia Landa, ao meu Tio Geo (*in memoriam*) e as minhas primas Naya e Manuela, por acreditarem no meu sonho e por todo o suporte em Recife. Aos meus avós, Iraci e Augusto, que me recebem de volta com os braços para os abraços, que são meu lar e me ensinam muito. Ao meu padrasto, Sandro, por tudo o que ele me ensinou e acreditou, sem nem mesmo saber o que praticava, e ainda cuida do que tenho de mais precioso.

Quando quis desistir, quando quis afundar, quando precisei de luz e uma mão para me reconhecer no meu pior, agradeço a minha maior amiga-irmã, Géssica. As almas afins se encontram por centro de conexão e a veterinária me colocou com algumas delas. Aos meus amigos, Ivina, Gustavo e Zé, por tudo o que passamos juntos, vivemos e nos apoiamos, por dentro do nosso mundo sermos a família um do outro. À Lucas Facundo, por tudo o que me ensinou, por ter me apoiado e sustentado todas as minhas barras quando eu mais precisei, eu ganhei um parceirão. Aos meus amigos, Rebeca, Eliana, Ykaro e Lela, por terem tomado conta de mim, por terem entrado na minha vida para nunca mais largar a minha mão.

Aquele que acredita em mim e continua contribuindo para profissional que serei, meu orientador Dr. Gustavo Ferrer, a quem devo muito e sou muito grata. A todos os professores que

me permitiram bater a porta, que me fazem profissional e ser humano. Aos orientadores, a equipe e aos amigos que fiz na EMBRAPA, meus sinceros agradecimentos.

Expresso minha antecipada gratidão aos membros da banca examinadora, pela dedicação e pela doação do tempo, suas contribuições são muito importantes para continuação do meu desenvolvimento profissional. A Universidade Federal Rural de Pernambuco que tornou e torna os sonhos possíveis.

Aqueles que caminharam comigo, que estão na minha vida, que compartilharam da vida comigo, que eu amo e que merecem espaço aqui, meus sinceros agradecimentos. Guardarei para sempre no meu coração todos os que me fazem ser quem hoje sou.

## EPÍGRAFE

*“Tenho duas armas para lutar contra o desespero, a tristeza e até a morte: o riso a cavalo e o galope do sonho. É com isso que enfrento essa dura e fascinante tarefa de viver.”*

(Ariano Suassuna)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fazenda Sucupira.....	14
<b>Figura 2.</b> Visão externa do centro de treinamento.....	15
<b>Figura 3.</b> (A) Brete de palpação de éguas. (B) Brete de palpação bovinos. (C) Seringa de passagem.....	15
<b>Figura 4.</b> Laboratório de processamento de sêmen e manipulação de embriões.....	16
<b>Figura 5.</b> (A) Piquetes dos garanhões; (B) Aprisco dos reprodutores pequenos ruminantes. .	17
<b>Figura 6.</b> (A) Pasto de fêmeas ovinas prenhes; (B) Curral; (C) Pocilga; .....	17
<b>Figura 7.</b> (A) Pasto para as éguas; (B) Pasto de bovinos Nelore; (C) Pasto de bovinos que compõem patrimônio genético .....	18
<b>Figura 8.</b> Alojamento da Fazenda Sucupira - Embrapa.....	18
<b>Figura 9.</b> Imagem da câmara de Neubauer, visualizando plaquetas (setas azuis e vermelhas) pelo método de Brecher. ....	31



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Animais manejados durante o período de ESO.....	20
<b>Tabela 2.</b> Atividades desenvolvidas com bovinos. ....	21
<b>Tabela 3.</b> Atividades desenvolvidas com caprinos.....	21
<b>Tabela 4.</b> Atividades desenvolvidas com equinos.....	21
<b>Tabela 5.</b> Atividades desenvolvidas com ovinos .....	22
<b>Tabela 6.</b> Atividades desenvolvidas com suínos.....	22
<b>Tabela 7.</b> Animais avaliados no laboratório de Andrologia Animal. ....	22
<b>Tabela 8.</b> Atividades desenvolvidas no Laboratório de Andrologia Animal.....	23
<b>Tabela 9.</b> Resultados absolutos obtidos após centrifugação do sangue das seis éguas em quatro métodos de centrifugação distintos.....	32
<b>Tabela 10.</b> Resultados multiplicativos, dado em fator de enriquecimento, obtidos após centrifugação do sangue das seis éguas em quatro métodos de centrifugação distintos. ....	32

## RESUMO

Com o presente trabalho, tem-se o propósito de descrever as atividades realizadas durante o estágio supervisionado obrigatório (ESO), disciplina obrigatória para conclusão do curso de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O estágio foi realizado inicialmente no Campo experimental Fazenda Sucupira – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos genéticos e Biotecnologias, Km 5 da DF 001, Riacho Fundo II e em seguida foi finalizado no Laboratório de Andrologia Animal, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (ANDROLAB/DMV/UFRPE), sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro durante o período de 02/11/2023 a 16/01/2024. Ao longo do estágio foi possível participar da rotina da Fazenda Sucupira e da rotina do ANDROLAB acompanhando e auxiliando na realização do experimento em reprodução equina, com ênfase em controle folicular, inseminação artificial em equinos, lavado de embrião equino, coleta e congelamento de sêmen. Além disso, também foi possível acompanhar outras atividades de pesquisa desenvolvidas no local do estágio e com outras espécies. O artigo científico foi redigido abordando a comparação entre quatro protocolos para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) na espécie equina.

**Palavras-chaves:** Reprodução equina; Fatores de crescimento; Terapia celular.

## ABSTRACT

The presente work aims to describe the activities carried out during the compulsory supervised internship, a compulsory subject for completion of the Veterinary Medicine course at the Federal Rural University of Pernambuco. The internship was initially carried out at the Fazenda Sucupira experimental field - Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologias, Km 5 of DF 001, Riacho Fundo II and was then completed at the Animal Andrology Laboratory, in the Department of Veterinary Medicine at the Federal Rural University of Pernambuco (ANDROLAB/DMV/UFRPE), under the guidance of Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro during the period from 02/11/2023 to 16/01/2024. Throughout the internship, it was possible to participate in the routine of Fazenda Sucupira and the ANDROLAB routine, accompanying and assisting in carrying out the equine reproduction experiment, with an emphasis on follicular control, artificial insemination in horses, equine embryo lavage, semen collection and freezing. It was also possible to follow other research activities carried out at the internship site and with other species. The scientific article was written to compare four protocols for obtention platelet-rich plasma (PRP) in horses.

**Keywords:** Equine reproduction; Growth factors; Cell therapy.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
2.1 Introdução sobre o ESO .....	13
2.2 Descrição do local do estágio .....	14
1.2.1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias – Fazenda Sucupira .....	14
1.2.2 Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) – DMV/UFRPE .....	18
2.3 Descrição das atividades .....	20
1.3.1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias – Fazenda Sucupira .....	20
1.3.2 Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) – DMV/UFRPE .....	22
2.4 Discussão das atividades desenvolvidas .....	23
1.4.1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias – Fazenda Sucupira .....	23
1.4.2 Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) – DMV/UFRPE .....	25
<b>2. CAPÍTULO II.....</b>	<b>27</b>
<b>Comparação entre quatro protocolos de preparação do plasma rico em plaquetas na espécie equina</b>	
2.1 Resumo .....	27
2.2 Introdução .....	27
2.3 Material e métodos.....	29
2.4 Resultados e discussão.....	32
2.5 Conclusão.....	34
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>40</b>

## **1. CAPÍTULO I**

### **1.1 Introdução sobre o ESO**

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) é uma parte fundamental da formação em Medicina Veterinária. O ESO proporciona aos estudantes a oportunidade de aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos durante a graduação em situações práticas e reais, sob supervisão profissional. É estruturado para permitir que os alunos explorem diferentes áreas da Medicina Veterinária e escolham aquela que mais os interessa. Durante o estágio, os alunos podem estar envolvidos em atividades práticas, procedimentos clínicos, cirúrgicos, e outras tarefas relacionadas à profissão veterinária.

A carga horária de 420 horas garante uma imersão suficiente para que os estudantes adquiram experiência prática significativa. Além disso, também permite que os alunos desenvolvam habilidades de trabalho em equipe, comunicação com clientes e colegas, e entendam melhor as demandas e desafios do cotidiano na profissão veterinária. É uma maneira eficaz de preparar os futuros médicos veterinários para a prática profissional, proporcionando uma transição mais suave do ambiente acadêmico para o mercado de trabalho.

O presente ESO ocorreu durante o período de 02.11.23 a 16.01.2024, totalizando as 420 horas necessárias a finalização desse componente curricular. Foi realizado no período de 02.10.23 a 22.12.23 na Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia - Fazenda Sucupira, campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos (CENARGEN), Riacho Fundo II – Distrito Federal, sob supervisão do Dr. Alexandre Floriani Ramos e no período de 02.01.24 a 16.01.24 na área de Reprodução Animal no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizado na Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, em Dois Irmãos, Recife-PE, sob supervisão da Prof<sup>a</sup> Dra Maria Madalena Pessoa Guerra. O ESO foi orientado pelo Prof<sup>o</sup> Dr Gustavo Ferrer Carneiro.

Com as abordagens práticas objetivou-se acompanhar e auxiliar na realização de exames ginecológicos, controle folicular, inseminação artificial, transferências de embrião, exames andrológicos, coleta de sêmen, teste de congelamento de sêmen, confecção do plasma rico em plaquetas e outras atividades, propendendo o conhecimento, principalmente sobre reprodução equina, e quando oportuno nas demais espécies.

## 1.2 Descrição do local do estágio

### 1.2.1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias – Fazenda Sucupira

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é uma das unidades descentralizadas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). O ESO em sua primeira etapa foi realizado na Fazenda Sucupira, o campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos - CENARGEN, que conta com atividades de conservação de raças comerciais de interesse zootécnico no Banco Genético da Embrapa e desenvolvimento de biotécnicas avançadas de reprodução animal.

**Figura 1.** Fazenda Sucupira.



Fonte: Embrapa

A Fazenda Sucupira é dividida em setores dos quais são subdivididos por espécie e sexo, sugerindo uma abordagem organizada para a gestão e cuidado do gado, levando em consideração diferentes categorias e necessidades. A sede é identificada como a parte administrativa e de manejo com fêmeas bovinas. Atividades realizadas na sede incluem aspiração folicular, produção *in vitro* de embriões, transferência de embriões e controle folicular. Estruturalmente, conta com um laboratório, que desempenha um papel crucial nas atividades relacionadas à reprodução bovina, contendo microscópio estereoscópio binocular de manipulação de embrião e oócitos, e estufa para cultivo celular, esse laboratório está integrado a área do curral que conta com dois bretes de palpação.

Além disso, a fazenda conta com um centro de treinamento (CT) (Figura 2), no qual são realizados os manejos com garanhões, touros, bodes e carneiros. Esse setor é formado por um curral com os bretes para manejo de éguas e bretes para manejo de bovinos (Figura 3). Somado a esse ambiente, é disposto o laboratório de processamento de sêmen e manipulação de embrião equino.

**Figura 2.** Visão externa do centro de treinamento.



Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 3.** (A) Brete de palpação de éguas. (B) Brete de palpação bovinos. (C) Seringa de passagem.



Fonte: Arquivo Pessoal

O laboratório é composto por cinco salas, dentre elas: Sala para esterilização e freezers verticais; Sala de congelamento e manipulação de embriões; Sala para análise de sêmen; Sala



administrativa; E um centro cirúrgico para realizações de inseminações por laparoscopia. A sala de congelamento de sêmen e manipulação de embrião (Figura 4) possui conexão direta com o curral, facilitando o recebimento dos materiais biológicos. Ela acomoda uma centrífuga, um banho-maria, dois freezers apenas para congelamento e uma microscópio estereoscópio binocular de manipulação de embrião. Entre essas salas está localizado mais um anexo que armazena outros equipamentos, como aparelho de ultrassom (Mindray P/B - Dp 2200 Vet), vagina artificial e eletroejaculadores para pequenos ruminantes e bovinos. Logo a frente, encontra-se uma sala de baixa luz utilizada apenas para análise do sêmen, que possui quatro microscópios sendo um de contraste de fase e duas placas aquecedoras.

**Figura 4.** Laboratório de processamento de sêmen e manipulação de embriões.

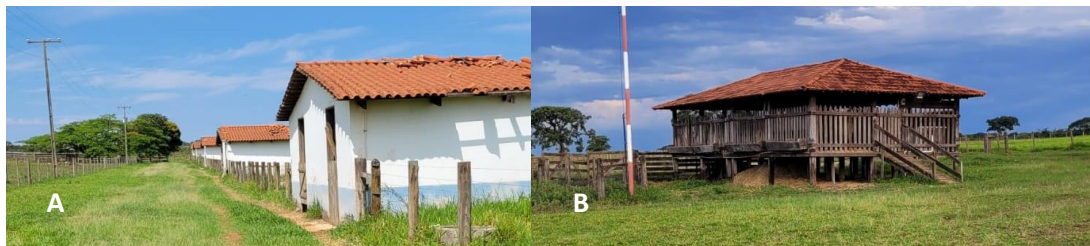


Fonte: Arquivo Pessoal

Externamente, mas ainda nas dependências do CT, está localizado um aprisco (Figura 5) onde são alocados os reprodutores ovinos e caprinos, sua divisão é por baias e mais um anexo com tronco para coleta de sêmen de ovinos e caprinos. Logo a frente, estão os piquetes dos garanhões, separadamente (Figura 5).



**Figura 5.** (A) Piquetes dos garanhões; (B) Aprisco dos reprodutores pequenos ruminantes.



Fonte: Arquivo Pessoal

O capril compõe outro setor, nele estão acomodadas as reprodutoras caprinas e ovinas, com um grande galpão no centro que é utilizado como maternidade e cria. Conta com anexo administrativo no qual são armazenados os medicamentos, um curral para atividades de reprodução (Figura 6) e áreas de pasto ao redor para as fêmeas de pequenos ruminantes (Figura 6). Próximo a essas dependências está localizada a pocilga (Figura 6), que conta com oito baias que permitem a separação dos suínos por raça.

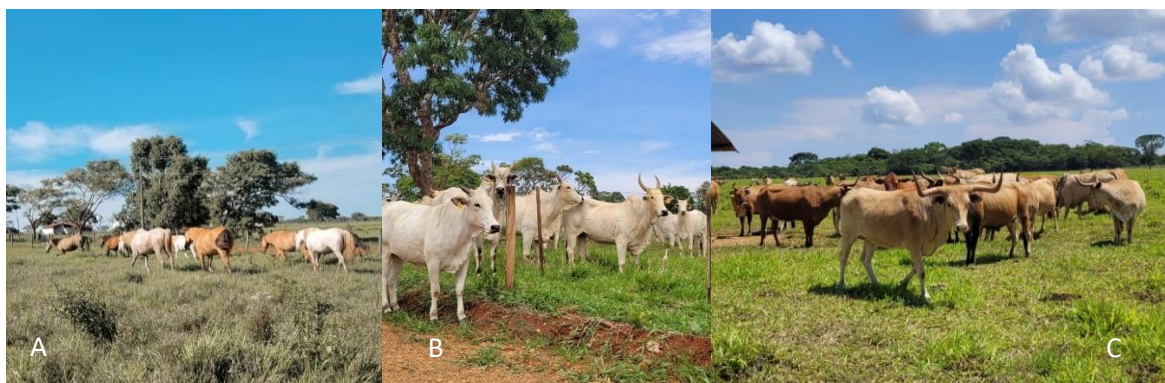
**Figura 6.** (A) Pasto de fêmeas ovinas prenhes; (B) Curral; (C) Pocilga;



Fonte: Arquivo pessoal

Além das áreas construídas com estrutura para manejo dos animais, a Fazenda Sucupira possui um extenso plano de piquetes para a pastagem dos animais e que permite um manejo rotacionado. Majoritariamente, éguas, vacas e touros desfrutam desses pastos (Figura 7) e estão localizados estrategicamente próximos aos locais de trabalho, facilitando o deslocamento otimizando a eficiência nas operações diárias.

**Figura 7.** (A) Pasto para as éguas; (B) Pasto de bovinos Nelore; (C) Pasto de bovinos que compõem patrimônio genético



Fonte: Arquivo Pessoal

Concordando com a necessidade de vivência a campo, a Embrapa dispõe de um alojamento dentro da fazenda, para estagiários e estudantes de pós-graduação que realizam pesquisa no local. A casa contém quinze quartos, uma cozinha, um banheiro feminino e outro masculino, lavanderia e sala. Externamente, possui um auditório para as discussões de casos, uma área social e suítes para uso dos pesquisadores.

**Figura 8.** Alojamento da Fazenda Sucupira - Embrapa



Fonte: Arquivo Pessoal

### **1.3 1.2.1 Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) – DMV/UFRPE**

A segunda etapa do ESO foi realizada no ANDROLAB, um centro especializado no estudo da Andrologia Animal, com uma equipe engajada em pesquisas científicas e análises especializadas, contribuindo para avanços no entendimento da reprodução de animais, especialmente bovinos, ovinos, caprinos e equinos.

O laboratório utiliza o Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) para visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas. Além disso, o laboratório conta com um aparelho de citometria de fluxo.

O CASA é um sistema computadorizado que permite a análise automatizada de características do sêmen, fornecendo informações precisas sobre as células espermáticas avaliadas. Essa tecnologia é amplamente utilizada em estudos de fertilidade, avaliação da qualidade do sêmen e pesquisa relacionada à andrologia. A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise de células suspensas em um fluxo contínuo, para a quantificação e caracterização de diferentes tipos com base em suas propriedades físicas e químicas.

**Figura 9.** (A) CASA; (B) Citômetro de Fluxo.



Fonte: Arquivo Pessoal

A sala de microscopia (Figura 10) está equipada com um microscópio de epifluorescência da marca Carl Zeiss®. O uso de um microscópio de epifluorescência é comum em pesquisas que requerem observação de estruturas celulares específicas marcadas com fluoróforos. Os fluoróforos (ou fluorocromos) são moléculas que absorvem fótons com energia de determinado espectro de excitação e reemitem esses fótons em determinado espectro de emissão (ou de fluorescência). Os microscópios dessa categoria possuem características avançadas, como alta resolução, capacidade de captura de imagens em fluorescência e configurações que permitem a análise detalhada de amostras biológicas.

**Figura 10.** Microscópio de epifluorescência.



Fonte: Arquivo Pessoal

O laboratório ainda dispõe de Microscópios Ópticos, sendo dois com contraste de fase e um convencional. Agitador vortex: Utilizado para homogeneizar amostras. Centrífuga: Usada para separar componentes de amostras através de centrifugação. Placa aquecedora: equipamento para aquecimento controlado de amostras. Duas máquinas de congelamento de sêmen, pHmêtro, osmômetros dois banhos-maria e balança de precisão.

### 1.3 Descrição das atividades

#### 1.3.1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias – Fazenda Sucupira

Durante o período do ESO foram realizadas diversas atividades em uma fazenda experimental, onde todos os procedimentos eram feitos por necessidade dos projetos de pesquisa dos estudantes de pós-graduação. A tabela a seguir (Tabela 1) demonstra o rebanho manejado durante o estágio, separados por espécie e raças.

**Tabela 1.** Animais manejados durante o período de ESO

<b>Espécie Animal</b>	<b>Raça</b>	<b>Rebanho</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Bovinos</b>	Pantaneiro	63	29,5%
	Mocho Nacional		
	Crioulo Lageano		
	Junqueira Curraleiro		
<b>Caprinos</b>	Moxotó	32	14,9%
	Marota		
<b>Equinos</b>	Pantaneiro	22	11,2%
	Campeiro		
	Bergamacia		
<b>Ovinos</b>		71	33,2%
	Morada Nova Santa Inês		
<b>Suínos</b>	Casco de Burro	24	11,2%
	Monteiro		
	Moura		
	Nilo Piau		
<b>Total</b>		214	100%

O objetivo do estágio foi o aprendizado sobre reprodução equina, entretanto, simultaneamente ocorriam experimentos em espécies diversas e quando oportuno todo o

manejo da fazenda era acompanhado e desenvolvido. Além do foco na reprodução animal dentro da fazenda, eventualmente, situações de ordem clínica ocorriam e havia necessidade de intervenção. Sendo assim, além das práticas reprodutivas, havia práticas de clínica e cirurgia. Somado a isso, os estagiários acompanhavam e se integravam a toda rotina de manejo nutricional dos animais. As atividades realizadas e acompanhadas durante o ESO podem ser consultadas a seguir, quanto a frequência e percentual.

**Tabela 2.** Atividades desenvolvidas com bovinos.

<b>Atividade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Cura do Umbigo	24	25,2%
Desmame	10	10,5%
Controle Folicular	45	47,3%
Inseminação Artificial	3	3,1%
Coleta de Sêmen	1	1%
Curativos	12	12,6%
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>100%</b>

**Tabela 3.** Atividades desenvolvidas com caprinos.

<b>Atividade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Manejo Nutricional	100	70,9%
Curativos	40	28,3%
Parto Natural	1	0,8%
<b>Total</b>	<b>141</b>	<b>100%</b>

**Tabela 4.** Atividades desenvolvidas com equinos.

<b>Atividade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Controle Folicular	512	83,25%
Inseminação Artificial	30	4,8%
Lavado de Embrião	17	2,7%
Coleta de sêmen	15	2,4%
Análise de Sêmen	15	2,4%
Congelamento de Sêmen	12	1,9%
Castração	2	0,3%
Curativos	12	1,9%

<b>Total</b>	<b>615</b>	<b>100%</b>
--------------	------------	-------------

**Tabela 5.** Atividades desenvolvidas com ovinos

<b>Atividade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Manejo nutricional	210	28,5%
Controle folicular	390	53,1%
Partos naturais	25	3,5%
Partos cesárea	1	0,13%
Coleta de sêmen	32	4,3%
Vacinação	15	2,1%
Desmame	22	2,0%
Curativos	40	5,4%
<b>Total</b>	<b>735</b>	<b>100%</b>

**Tabela 6.** Atividades desenvolvidas com suínos.

<b>Atividades</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Coleta biológica (DNA)	3	40%
Curativos	4	60%
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>100%</b>

### 1.3.2 Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) – DMV/UFRPE

Durante o período de ESO foram desenvolvidas atividades relacionadas a rotina do Laboratório de Andrologia Animal nas atividades dos projetos de pesquisa. Entretanto, o foco do estágio no laboratório foi a pesquisa sobre o Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

**Tabela 7.** Animais avaliados no laboratório de Andrologia Animal.

<b>Espécie Animal</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Equino	17	73%
Ovino	6	27%
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>100%</b>

As atividades que foram acompanhadas e desenvolvidas no decorrer do ESO foram computadas na Tabela 8. Essas atividades se concentram nas avaliações do sêmen e de todas as etapas de confecção do plasma rico em plaquetas.

**Tabela 8.** Atividades desenvolvidas no Laboratório de Andrologia Animal.

<b>Atividade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Coleta de Sangue	11	9,2%
Coleta de Sêmen	6	5,1%
Processamento de PRP	39	32,7%
Avaliação de cinética espermática	6	5,1%
Avaliação no CASA	6	5,1%
Análise de Fluorescência	6	5,1%
Congelamento de Sêmen	6	5,1%
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100%</b>

#### **1.4 Discussão das atividades desenvolvidas**

##### **1.4.1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias – Fazenda Sucupira**

Mediante os resultados supracitados nas tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 é possível observar que a maior parte do estágio supervisionado foi desenvolvido com a espécie equina, com foco no controle folicular de éguas pantaneiras e campeiras, tendo a maior frequência (512). Esse dado sugere que esse aspecto foi de ênfase significativa durante o estágio.

O objetivo do controle folicular em programas de reprodução é de grande importância, visto que, a partir disso pode-se inferir o momento certo para a inseminação. O controle folicular é componente do programa de congelamento de embriões, as éguas são diariamente submetidas a palpação para avaliação da espessura e contratilidade do útero, simetria dos cornos, tamanho e flutuação dos ovários, e exame ultrassonográfico transretal. Quando atingem um folículo acima de 35mm somado a um edema acima de II, devem ser induzidas a ovulação (Newcombe, 2011). Ao implementar programas reprodutivos, deve-se considerar o controle hormonal no momento da ovulação, sendo uma ferramenta eficaz em ganhos reprodutivos, para isso pode-se utilizar o hCG (Gonadotrofina coriônica humana) e análogos de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofinas).

O hCG é uma molécula produzida pela placenta humana e tem efeito análogo ao do LH (Wilson et al., 1990). As respostas ovulatórias induzidas por hCG variam em aproximadamente



36 horas após a indução (Samper et al., 2002). A histrelina é uma molécula sintética, análogo ao GnRH e é utilizado na indução e sincronização da ovulação em éguas (Strelin®, 2021). As éguas objeto de estudo na Fazenda Sucupira foram induzidas com análogo de GnRH, (Strelin®). Após a indução da ovulação com histrelina em éguas com folículo  $\geq 33$ mm de diâmetro, na dose recomendada pelo fabricante: 1ml por via intramuscular (Botupharma®), no intervalo de 24 horas, as éguas eram inseminadas com sêmen refrigerado ou fresco, e submetidas ao exame ultrassonográfico transretal para confirmação da ovulação em uma janela de 48 horas.

A inseminação artificial, no manejo com equinos, foi a segunda maior frequência relatada (30). Para inseminação artificial o sêmen foi coletado de 5 garanhões com vagina artificial. Após a coleta o sêmen foi avaliado de acordo com suas características macroscópicas (Volume e aspecto: cor e densidade) e em seguida passou pelas análises microscópicas (Motilidade (acima de 50%), vigor e concentração espermática (Mínima de 50milhões-sptz/ml) (CBRA, 2013). Após as avaliações, determinação da motilidade e concentração, o sêmen foi fracionado na dose inseminante convencional (500milhões/sptzMóveis) (CBRA, 2013). Em seguida as éguas foram inseminadas via transcervical com deposição intrauterina. Após a inseminação e confirmação da ovulação, as éguas eram submetidas a lavado uterino para posterior congelamento de embriões em outro campo experimental, atividade que não foi acompanhada. Esse procedimento segue as práticas comuns de reprodução assistida em equinos e demonstra um cuidadoso acompanhamento do processo para maximizar as chances de sucesso na inseminação artificial e na produção de embriões.

Outras atividades desenvolvidas com alta frequência foram, o manejo nutricional (210) e o controle folicular de fêmeas ovinas (390). O manejo nutricional é uma prática diária e intensa, o rebanho de fêmeas prenhes era o de maior número e por isso era provido de cuidados especiais. Durante o período gestacional em mamíferos, a demanda energética aumenta significativamente, sendo a glicose uma fonte crucial de energia para o desenvolvimento fetal (Serrila & Martínez, 2003). Essa demanda energética nas ovelhas prenhes, aumenta ainda mais durante o terço final da gestação, conseqüentemente, uma nutrição adequada durante essa fase é crucial para garantir o bom estado de saúde da ovelha gestante e o desenvolvimento saudável do feto (Lima, et al., 2012). As ovelhas recebiam silagem e farelo de milho duas vezes ao dia, e suplementadas com sal mineral. Além disso, tinham livre demanda a pasto, sendo privadas no fim do dia. Essa atividade era realizada diariamente devido à alta demanda de serviço.

O controle folicular de fêmeas ovinas em um programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizado com objetivo de sincronização do estro e da ovulação através de



tratamentos hormonais. Ao implementar programas de sincronização do estro em ovinos, é importante considerar cuidadosamente o tipo de dispositivo intravaginal e progestágeno utilizado, bem como monitorar a resposta ovariana para otimizar a eficácia do processo (Romano, 2004). O CIDR® foi o dispositivo de escolha, com uma aplicação inicial de PGF-2-alfa e manutenção do dispositivo por 7 dias, com avaliações a cada 24 horas. Após esse período o dispositivo foi retirado, e os grupos submetidos a diferentes protocolos hormonais que eram foco da pesquisa, então eram avaliados por ultrassonografia a cada 8 horas até o momento da ovulação.

#### **1.4.2 Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) – DMV/UFRPE**

De acordo com as atividades desenvolvidas no Laboratório de Andrologia Animal (Tabela 8) a atividade de maior frequência desenvolvida foi com a espécie equina na confecção de PRP e contagem manual de plaquetas. O PRP, ou plasma rico em plaquetas, é uma terapia derivada do próprio sangue do paciente, na qual o sangue é centrifugado para separar suas diferentes fases. O objetivo é obter uma concentração plaquetária elevada para aproveitar as propriedades terapêuticas das plaquetas (Balarugan et al., 2019). A utilização do PRP tem despertado um interesse significativo na comunidade científica e na área da medicina veterinária devido os seus benefícios potenciais (Mota, et al., 2022). A capacidade do PRP em promover a cicatrização, estimular a regeneração tecidual e modular a resposta inflamatória tem levado a uma investigação contínua sobre suas aplicações clínicas (Fantini, et al., 2022). O desenvolvimento dessa pesquisa, resulta no artigo científico no capítulo II.

Além das atividades desenvolvidas com PRP, foi possível realizar as biotécnicas do sêmen. A conservação do sêmen equino por meio de técnicas de refrigeração e congelamento é uma prática essencial utilizada na rotina da reprodução equina, permitindo a preservação da informação genética de garanhões de alto valor genético (Oliveira, et al., 2013). Essas técnicas oferecem vantagens significativas, como o prolongamento do tempo de armazenamento, facilidade de transporte e a capacidade de distribuição internacional (Oliveira, 2021). No entanto, é importante notar que o processo de criopreservação, especialmente a congelamento, pode causar danos às células espermáticas, é por isso que neste processo, é necessária a avaliação inicial da cinética espermática e as análises de fluorescência.

A cinética espermática pode ser avaliada em um microscópio convencional, inferindo os parâmetros de motilidade, vigor e concentração. Entretanto, com o avanço tecnológico, foi desenvolvido o CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) que se refere a um software utilizado para a análise automatizada da cinética espermática. Essa ferramenta é amplamente

empregada em laboratórios de andrologia e reprodução assistida para avaliar diversos parâmetros relacionados à movimentação dos espermatozoides. A automação proporcionada pelo CASA facilita a padronização e a objetividade na interpretação desses parâmetros, sendo uma ferramenta valiosa em pesquisas.

A análise de fluorescência é realizada com corantes fluorescentes que emitem luz visível quando excitados por luz de uma determinada faixa de comprimento de onda, eles são frequentemente utilizados como sondas em biologia celular para identificar condições subcelulares, permitindo a visualização e análise de estruturas ou processos específicos dentro das células (Sousa et al., 2012). A leitura de amostras coradas com sondas fluorescentes pode ser realizada tanto em microscópio de fluorescência quanto em citômetro de fluxo. Ambas as abordagens oferecem vantagens específicas.

Desse modo, foi possível acompanhar a rotina da fazenda sucupira e aprofundar os conhecimentos sobre reprodução e manejo dos animais de produção. Além disso, com a rotina do Androlab foi possível o desenvolvimento e finalização do artigo científico, focado na produção do plasma rico em plaquetas.

## **2. CAPÍTULO II**

### **Comparação entre quatro protocolos de preparação do plasma rico em plaquetas na espécie equina**

#### **2.1 Resumo**

O plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um hemoderivado utilizado na terapia de diversas áreas da Medicina Veterinária, entre elas a Medicina Equina. O uso do PRP se dá devido a sua capacidade de antecipar a diferenciação celular, estimular a angiogênese e aumentar a matriz extracelular através de mediadores químicos. A técnica manual de processamento de PRP consiste na coleta de sangue, que após processo de centrifugação, resulta em um pequeno volume de plasma com maior concentração de plaquetas e fatores de crescimento. Mediadores químicos, são citocinas, que modulam as respostas imunológicas e inflamatórias do organismo. Devido essas características, o PRP foi estudado como agente no tratamento de endometrites em éguas, uma vez que, esta é uma das mais importantes patologias que acometem o sistema reprodutivo dos equinos, sendo considerada uma das maiores causas de subfertilidade e infertilidade. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar a contagem manual das plaquetas e estabelecer um protocolo de processamento mais adequado, atingindo assim uma maior concentração plaquetária na amostra, mediante a relação de parâmetros de velocidade e tempo de centrifugação. Para tal, foram selecionadas seis éguas híginas, com contagem de plaquetas do sangue total superior a 100.000 plaquetas  $\mu\text{L}^{-1}$ . Foram testados diferentes protocolos para obtenção do PRP: Protocolo (P)1- 1ª centrifugação 100G/15 min e 2ª centrifugação 1.600G/20min; P2-1ª centrifugação 300G/5min e 2ª centrifugação 700G/15min; P3-1ª centrifugação 400G/15 min e 2ª centrifugação 1.000G/10min. P4-1ª centrifugação 120G/10 min e 2ª centrifugação 240G/10min. A primeira centrifugação, tem como objetivo a separação dos leucócitos, hemácias e as plaquetas e a segunda centrifugação concentra as plaquetas, produzindo o PRP. Na avaliação laboratorial, foram utilizados 15mL de sangue total e desse volume foram obtidos 1,5ml de PRP em cada protocolo. Os métodos de centrifugação do P1, P3 e P4 no presente estudo demonstraram enriquecimento plaquetário superior ao sangue total, o que não ocorreu no P2. Entretanto, apenas os protocolos 3 e 4 conseguiram atingir uma diferença significativa de aumento em relação ao sangue total. Sendo assim, os protocolos 3 e 4 são os que demonstraram eficiência na confecção do plasma rico em plaquetas.

#### **2.2 Introdução**

A equinocultura estabeleceu sua importância desde as civilizações mais antigas, pois tornava possível o deslocamento e os trabalhos de tração. Atualmente sua abrangência se

estende aos esportes e ao lazer (Sales, 2018), contribuindo ativamente para economia (Guasti, 2022). O Brasil, ocupa a quarta posição na equinocultura no cenário mundial (FEI, 2021). Arelado ao crescimento da criação de equinos no mundo, as patologias associadas também cresceram concomitantemente, sendo necessário a pesquisa e avanço de novas técnicas terapêuticas.

A busca por novas abordagens terapêuticas determinou a descoberta do plasma rico em plaquetas (PRP). Seu potencial foi atribuído devido as propriedades regenerativas, antiinflamatórias e catalisadoras do processo cicatricial (Mota et al., 2022; Fantini, et al., 2021; Santos et al., 2020). O uso desse concentrado está sendo explorado na medicina veterinária nas mais diversas áreas, pois existe uma eficácia no tratamento de lesões osteoarticulares, em endometrites, em laminites (Kwirant et al., 2019) em lesões oftálmicas, como a ceratite ulcerativa (Bezerra neto, 2020) e na adição de diluentes de sêmen (Yan et al., 2021).

O PRP é um hemoderivado, obtido através de centrifugação do sangue autólogo, no qual objetiva-se a separação em fases heterogêneas de plasma e hemácias, para obtenção de uma dose plaquetária suprafisiológica (Balarugan et al., 2019; Fitzpatrick, et al., 2017). Seu efeito terapêutico deriva-se da alta concentração e da atividade plaquetária, que quando estimuladas, são ativadas, degranulam e liberam diversos fatores de crescimento (FC) com atividade biológica, estimulando a angiogênese e reparação tecidual, culminando na diminuição da resposta inflamatória local e maior regeneração (Miranda, 2018; Cavallo et al., 2016). Além disso, é provido de propriedades microbicidas, determinadas pela liberação dos membros da família do fator plaquetário 4 (PF-4) (Yeaman et al., 2006).

Os fatores de crescimento são proteínas contidas dentro dos  $\alpha$ -grânulos plaquetários, biologicamente ativas, que são responsáveis por induzir quimiotaxia e mediar as respostas proliferativas e de diferenciação tecidual (Santos et al., 2020). Os FC alvo dos estudos científicos são: Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF); Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF); Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1(IGF-1); Fator de Crescimento de Fibroblástico (FGF); Fator de Crescimento Epidermal (EGF); Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF); Fator de Crescimento de Transformação- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Marx, 2004; Bendinelli et al., 2010).

O PDGF é uma proteína, que exerce função nos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  nas células, que estão correlacionados a tirosina quinase, expressando potenciais efeitos mitogênicos (Casati, 2015). O IGF-1 participa da fase inflamatória e proliferativa dos ferimentos, estimulando a migração dos fibroblastos para o local da lesão, maximizando a produção de colágeno (Molly, et al 2003).

O TGF- $\beta$ 1 regula a mitogênese das células epiteliais, fibroblásticas e o osteoplásticas, além disso, regula a síntese de colágeno (Maia et al., 2009).

Para humanos, um PRP com enriquecimento é descrito como aquele que atinge uma concentração de quatro a cinco vezes maior de plaquetas, quando comparado a contagem no sangue total (Marx, 2004). Entretanto, a concentração plaquetária na espécie equina é a mais baixa dentre os mamíferos, por isso o PRP já pode ser descrito como aquele que contém concentrações plaquetárias de duas a três vezes maior (Fontenont et al., 2012; Balarugan et al., 2019). Um estudo realizado com frações do tecido do tendão flexor digital profundo, em cultivo celular *in vitro*, obteve-se eficiência com um PRP de contagem 395 plaquetas/ $\mu$ L (Schanábel et al., 2007). Os métodos de obtenção de PRP na espécie equina são diversos, entretanto, as maiores concentrações são atingidas em protocolos de dupla centrifugação (Pereira et al., 2013).

Os benefícios da aplicação do PRP são descritos e validados na medicina equina em estudos recentes, no tratamento de feridas cutâneas (Pereira et al., 2019), criopreservação de sêmen (Abdulla et al., 2022), ceratite ulcerativa (Bezerra neto et al., 2020), tendinite e desmíte (Santos et al., 2020). Um estudo realizado por Dawod (2021), comprovou que a infusão intrauterina de PRP em éguas reprodutoras teve capacidade de aumentar a taxa de prenhez. Quando adicionado a sêmen humano para criopreservação, o PRP melhorou a motilidade progressiva, viabilidade e integridade de membrana, demonstrando um efeito crioprotetor para espermatozoides (Yan et al., 2021)

Diversas técnicas têm sido adotadas para a preparação do PRP, entretanto, não há um protocolo padrão-ouro (Miranda et al., 2019). Logo, é imprescindível que estudos sejam efetuados para a melhor exploração e utilização do PRP, por métodos eficazes e de fácil execução, determinando o melhor protocolo para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) objetivando posterior utilização nos planos terapêuticos das enfermidades dos equinos.

### **2.3 Material e métodos**

#### **Cômite de ética**

Este estudo teve aprovação do Cômite de ética e Uso Animal, sob o CEUA nº 1747200622.

#### **Seleção de animais**

Utilizou-se seis éguas híbridas, da raça Quarto de Milha, pesando em média 400kg, com idade entre 6 e 16 anos, cujos parâmetros hematológicos e clínicos foram previamente avaliados. Para a seleção, foram incluídos no estudo animais que obtiveram um número de

plaquetas no sangue total superior a 100.000 plaquetas  $\mu\text{L}^{-1}$ . Os equinos foram mantidos em baias individuais e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. As avaliações laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica – UFRPE, utilizando o contador hematológico automático, afim de realizar apenas uma triagem, sem fins comparativos entre métodos manuais e automáticos.

### **Coleta de Sangue**

O sangue foi coletado por venopunção da jugular externa, com tricotomia e preparação antisséptica do local, utilizando agulhas a vácuo 21G e tubos com anticoagulante citrato de sódio a 3,2%. Para as avaliações, utilizou-se 5 tubos por protocolo para cada animal, obtendo aproximadamente 18 ml de sangue. Dos cinco tubos, quatro foram reunidos em tubo falcon de 15 ml, para uma faixa de PRP maior, e o tubo restante utilizado para a contagem em sangue total.

### **Processamento e padronização das amostras**

No processamento das amostras de sangue para obtenção do PRP, foi estabelecido quatro protocolos (P) distintos, partindo dos princípios comparativos disponíveis em literaturas mais recentes. Os protocolos de centrifugação (P1, P2, P3 e P4) foram retirados, respectivamente, de Muthu et al., (2022), Seidel et al., (2019), Segabinazzi et al., (2021) e Miranda et al., (2019).

- P1: 1ª Centrifugação 100G/15 min e 2ª Centrifugação 1.600G/20min;
- P2: 1ª Centrifugação 300G/5min e 2ª Centrifugação 700G/15min
- P3: 1ª Centrifugação 400G/15 min e 2ª Centrifugação 1.000G/10min;
- P4: 1ª Centrifugação 120G/10 min e 2ª Centrifugação 240G/10min;

A primeira centrifugação separa o sangue em três fases heterogêneas, segundo Seidel (2019), quando um período de 25 minutos é incluído após as centrifugações, ocorre uma menor ativação plaquetária. Ao fim da primeira centrifugação, o tubo foi deixado em repouso por 25 minutos, foram descartadas, aproximadamente, 5 ml do plasma pobre em plaquetas (PPP). O tubo, contendo o volume restante, é submetido a uma segunda centrifugação, que tem por objetivo concentrar o número máximo de plaquetas na porção intermediária, entre PPP e as células sanguíneas (CV).

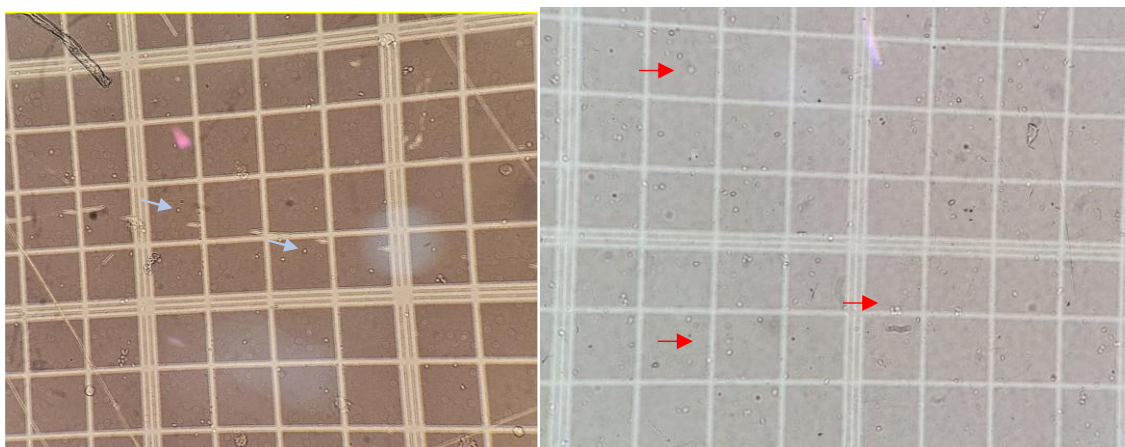
A padronização do PRP se deu após a segunda centrifugação, período de descanso de 25 minutos pós centrifugação, descartou-se 1/3 do tubo, correspondente a 50% do volume total e foi pipetado 1 ml acima da capa leucocitária e 2-6mm abaixo. Todo o processamento das amostras foi realizado em temperatura ambiente.

## Contagem Manual de Plaquetas

A contagem manual de plaquetas foi escolhida por ser um método que quantifica e avalia as plaquetas individualmente, o que não ocorre em métodos automáticos, podendo um agregado plaquetário ser interpretado como uma única plaqueta. A quantificação da amostra de PRP foi realizada em câmara hematómica de Neubauer, pelo método de Brecher. As plaquetas em sangue total também foram contadas pelo mesmo método manual utilizado da contagem no PRP, objetivando um comparativo em relação a concentração plaquetária inicial. Essa contagem pode ser realizada por métodos automatizados, embora o Conselho internacional para a Padronização da Hematologia tenha a técnica de contagem direta com hemocítmetro o padrão ouro, por se tratar de uma contagem em valores absolutos (Tasker et al., 2001).

O método de Brecher, é um método de contagem de plaquetas, no qual adiciona-se em um tubo de ensaio 2ml de oxalato de amônio a 1% e 20 microlitros de amostra em análise. Após a homogeneização da solução, preenche-se a câmara de Neubauer e encuba-se em câmara úmida por 10 minutos, e a contagem é realizada após esse período, obtendo-se o resultado de plaquetas por ml.

**Figura 9.** Imagem da câmara de Neubauer, visualizando plaquetas (setas azuis e vermelhas) pelo método de Brecher.



Fonte: Xavier (2024)

## Determinação do enriquecimento plaquetário

A determinação do enriquecimento plaquetário foi dado entre o número de plaquetas em sangue total e o número multiplicativo alcançado na concentração plaquetária do PRP. O número obtido em sangue total foi o valor absoluto, e a variação da contagem de plaquetas após a instituição dos diferentes protocolos, foi denominado como o fator de enriquecimento. Exemplificativamente, se a contagem em sangue total era de 100plaquetas/ $\mu$ L e a contagem no

plasma era de 160plaquetas/ $\mu$ L, nessa amostra o fator de enriquecimento será de 1,6 (Segabinazzi et al., 2021).

### Análise estatística

Para a comparação múltipla das médias, utilizou-se o teste de Turkey.

## 2.4 Resultados e discussão

**Tabela 9.** Resultados absolutos obtidos após centrifugação do sangue das seis éguas em quatro métodos de centrifugação distintos.

	Égua A	Égua B	Égua C	Égua D	Égua E	Égua F
ST(x10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	170	130	162,5	165,5	175	182,5
P1(x10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	260	282,5	355	302,5	287,5	287,5
P2(x10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	237,5	342,5	225	292,5	252	257,5
P3(x10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	330	550	490	430	532,5	452,5
P4(x10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	370	300	452,5	460	302,5	537,5

ST-Sangue Total; P1- Protocolo 1; P2 - Protocolo 2; P3 - Protocolo 3; P4 – Protocolo 4;

**Tabela 10.** Resultados multiplicativos, dado em fator de enriquecimento, obtidos após centrifugação do sangue das seis éguas em quatro métodos de centrifugação distintos.

	Fator de Enriquecimento				
	ST	P1	P2	P3	P4
Égua A	170	2,6	2,3	3,3	3,7
Égua B	130	2,8	3,4	5,5	3,0
Égua C	162,5	3,5	2,2	4,9	4,5
Égua D	165,5	3,0	2,9	4,3	4,6
Égua E	175	2,8	2,5	5,4	3,0
Égua F	182,5	2,8	2,5	4,5	5,3
	<b>ST</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
	<b>158,3<math>\pm</math>24,7c</b>	<b>307,5<math>\pm</math>67,2b</b>	<b>238,5<math>\pm</math>19,1bc</b>	<b>450,0<math>\pm</math>93,8a</b>	<b>367,7<math>\pm</math>80,2a</b>

ST-Sangue Total; P1- Protocolo 1; P2 - Protocolo 2; P3 - Protocolo 3; P4 – Protocolo 4;

Em todos os protocolos, os resultados obtidos foram referentes ao aumento da contagem de plaquetas proporcionais a contagem inicial em sangue total, sendo assim, os resultados são dados multiplicativos que expõem a eficiência de cada protocolo.

A pesquisa objetivou a determinação de um protocolo de preparação do PRP que atingisse a maior concentração plaquetária em duas centrifugações. O enriquecimento de



plaquetas quando comparado ao sangue total foi alcançado nos protocolos P1, P3 e P4. Entretanto, o P2 não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) de enriquecimento quando comparado a contagem em sangue total, demonstrando que no presente estudo esse protocolo não possuiu eficiência em concentrar plaquetas. Além disso, os resultados obtidos do P1 e do P2, não atingiram diferença significativa entre eles ( $P>0,05$ ). O protocolo com menor fator de enriquecimento plaquetário (2,2) (2,3) no PRP foi preparado pelo P2, demonstrando que não houve diferença do grupo controle, demonstrando ineficácia para a confecção do plasma rico em plaquetas para a espécie equina.

O enriquecimento de plaquetas de maior aumento (5,5) foi atingido pelo protocolo P3, seguido de um aumento de (5,4) no mesmo protocolo. Quando comparado a concentração plaquetária em sangue total, o P3 atingiu considerável diferença significativa ( $P<0.001$ ). O mesmo ocorreu nos dados obtidos do protocolo P4, no qual, obteve uma diferença significativa do sangue total, e nenhuma diferença quando comparado ao P3 ( $P>0.05$ ).

O beneficiamento obtido com a aplicação de PRP em processos patológicos é de grande interesse na medicina veterinária, sendo assim, a escolha de uma metodologia mais eficiente é determinante para uma maior concentração plaquetária, conseqüentemente, a maior liberação de fatores de crescimento (Dawod, 2021; Schneider, 2020; Kwirant, 2019; Aleixo et al., 2017). Os estudos descrevem os fatores interferentes no processo de preparação do PRP, sendo eles, velocidade, tempo e quantidade de centrifugações, local de colheita, volume e o tipo de anticoagulante, que acarreta variações na concentração e sua eficácia biológica *in vivo*. Quando relacionada a idade dos animais, independentemente do método ou protocolo, não houve diferença significativa (Miranda et al., 2019).

Seidel et al., (2019) obtiveram uma maior concentração plaquetária quando a amostra foi submetida a protocolos de duas centrifugações, tendo atingido concentrações de até 7,6 vezes maiores, o que não ocorreu quando o protocolo foi instituído no presente estudo, na qual as concentrações obtidas foram inferiores. Entretanto, Balamaguran et al., 2019, consideraram um PRP de qualidade com dosagem de duas a três vezes superiores ao sangue total.

Muthu et al., (2022) correlacionaram o efeito do volume na eficiência da amostra, que em uma amostra de 15ml atingiu-se uma concentração plaquetária de até 4,5 vezes maior do que a contagem de sangue inicial, não havendo reflexo no presente estudo, no qual obteve-se um fator de enriquecimento igual a (3,4). Quando o protocolo 3 foi instituído na preparação de PRP em bolsas de transfusão de sangue de 150ml, o enriquecimento atingido foi de (5,6) (Segabinazzi et al., 2021), refletindo em resultados equivalentes no presente estudo, demonstrando a não influência do volume de coleta. Somado ao aumento da concentração plaquetária, métodos com centrifugação de alta velocidade e com maior tempo de

centrifugação, interferem positivamente na modulação da resposta de diferenciação e proliferação, pois resultam numa maior liberação de TGF- $\beta$  e VEGF (Suter et al., 2004).

Para inibição da agregação plaquetária e sua viabilização, o citrato de sódio é o anticoagulante de eleição, pois preserva a integridade da membrana plaquetária (Trindade-Suedam et al., 2007) e foi associado com uma maior indução de matriz mesenquimal (Pachito, 2021). O mecanismo de anticoagulação promovido pelo citrato de sódio pode ser facilmente revertido com a adição de cálcio, viabilizando seu uso em outras técnicas (Kerr, 2003).

As plaquetas encontram-se inativas no sangue, em condições fisiológicas não interagem com o endotélio vascular (Andrews, 2004). Além disso, componentes que não estão comumente no espaço intravascular, podem ativar a via intrínseca da cascata de ativação e coagulação (Ferreira et al., 2010). Por isso, em diversos protocolos, são adicionados períodos de descanso entre as centrifugações, visando a diminuição da ativação plaquetária (Vendruscolo et al., 2011; Seidel et al., 2019). Mesmo que na segunda etapa de centrifugação as amostras sejam submetidas a uma força G maior, a viabilidade plaquetária não é afetada (Segabinazzi et al., 2021).

O presente estudo contém procedimentos descritos que produzem PRPs de características diversas abrangendo apenas a concentração plaquetária. Estima uma atividade proliferativa. Mais estudos serão necessários realizando a mensuração dos fatores de crescimento e com a utilização em tecidos biológicos vivos para confirmação absoluta da eficácia terapêutica.

## **2.5 Conclusão**

Os protocolos 3 e 4 demonstraram eficiência em produzir PRP com alto enriquecimento plaquetário, enquanto a utilização dos protocolos 1 e 2 não apresentam vantagem para concentrar plaquetas de equinos. Essa pesquisa demonstra a importância de avaliar diferentes protocolos para a obtenção de PRP, destacando a variação na eficiência entre eles. Essas informações podem otimizar futuras práticas clínicas, reprodutivas ou de pesquisa na área de enriquecimento de plaquetas em equinos, garantindo a escolha dos métodos mais eficazes.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estágio proporciona a oportunidade de aplicar na prática os conhecimentos adquiridos durante o curso, permitindo que o aluno desenvolva habilidades essenciais para sua futura profissão. Somado a isso, o estudante pode aprimorar suas habilidades de raciocínio clínico, tomada de decisões e técnicas específicas da área de reprodução animal. O estágio não apenas contribui para o desenvolvimento técnico, mas também para o crescimento pessoal e interpessoal, uma vez que o aluno interage com colegas de profissão e pacientes.

A importância do estágio na área de reprodução animal está em aprofundar o entendimento sobre técnicas, bem como para determinar a capacidade reprodutiva dos animais. Esse entendimento demonstra a relevância do estágio como uma etapa fundamental no processo de aprendizagem, integrando teoria e prática de maneira a enriquecer a formação do aluno e prepará-lo adequadamente para os desafios do mercado de trabalho.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AMABLE, P. R; CARIAS, R. B; TEIXEIRA, M. V; CRUZ-PACHECO, L; CORREA DO AMARAL, R. J; GRANEJIRO, J. M; BOROJEVIC, R; Preparação de plasma rico em plaquetas para medicina regenerativa: otimização e quantificação de citocinas e fatores de crescimento. **Res. de células troncos** v.3, n.7. 2013.
- ANDREWS, R. K; BERNDT, M. C; Platelet physiology and thrombosis. **Thromb Research**, v. 114, n. 5, p.447-453, 2004.
- BALAMURUGAN, K; SHAMMI, M; GEORGE, R. S; KANNAN, T. A; SIVASHANKAR, R. Preparation of autologous platelet rich plasma in Kathiawari and thoroughbred horses. **Internacional journal of current microbiology and Applied sciences**, v.8, n.4, p. 1689-1691, 2019.
- BENDINELLI, P; MATTEUCI, E; DOGLIOTTI, G; CORSI, M. M; BANFI, G; MARONI, P; DESIDERIO, M. A. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: Mechanisms of NF- $\kappa$ B inhibition via HGF. **Journal of cellular physiology**, v. 225, n.3, p.757-766, 2010.
- BEZERRA NETO, L. H. S; MOURA, M. V. L; VAGO, P. B. Uso do plasma rico em plaquetas associados a colírios no tratamento de ceratite ulcerativa em equino. **Ciência Animal**, v.30, n.1, p137-144, 2020.
- BOSWELL S. G; COLE, B. J; SUNDMAN, E. A; KARAS, V; FORTIER, L. A. Platelet-Rich Plasma: A Milieu of Bioactive Factors. *Arthroscopy*. **The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 28, n. 3, p. 429–439. 2012.
- CAVALLO C, et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. **BioMed Research International**, 2016.
- CERRILLA, M. O. E; MARTÍNEZ, G. M; Starch digestion and glucose metabolismo in the ruminant: A review. **Interciencia-caracas**, v.28, n.7, p.380-386, 2003.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3.ed. CBRA, 2013. Belo Horizonte.
- DAWOD, A; MIRO, J; ELBAZ, H. T; FAHMT, H; ABDOON, A. S. Effect of intrauterine infusion of equine fresh platelets-rich plasma (PRP) or Lyophilized PRP (L-GF equina) on Ovarian activity and pregnancy rate in repeat breeder purebred arabian mares. **Animals**, v.11, n.4, 2021.
- FANTINI, P; JIMÉNEZ, R; VILÉS, K; IBORRA, A; PALHARES, M. S; CATALÁN, J; PRADES, M; MIRÓ, J. Simple tube centrifugation method for platelet-rich plasma (PRP) preparation in catalonian Donkeys as a treatment of edometritis-endometrosis. **Animals**, v.11, n.10, 2021.
- FERREIRA, C. N; SOUSA, M. O; DUSSE, L. M. S; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.5, p.416-421. 2010.

- FITZPATRICK, J; BULSARA, M; ZHENG, M. H. The effectiveness of platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy. **American Journal of Sports Medicine**. Vol. 45, N. 1, 2017.
- FONTENOT R. L; SINK C. A; WERRE S. R; WEINSTEIN N. M; DAHLGREN L. A. Centrifugação em tubo simples para processamento de plasma rico em plaquetas no cavalo. **Can Vet**, 2012.
- GUASTI, P. N; JÚNIOR, J. A. D. Estratégias para melhorar a qualidade seminal em garanhões. **Associação brasileira de Andrologia animal**, v. 46, n. 2. p. 170-175, 2022.
- KERR, M.G. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica, Clínica e Hematologia**, p.45-59. CIn: Ibid. (Ed.), São Paulo, 2003.
- KWIRANT, L. A. A; CORTE, F. D; CANTARELLI, C; CARGNELUTTI, J.F; MARTINS, M; CABRAL, M. W; MACIEL, N; RUBIN, M. I. B; Cooling and Cryopreservation of Equine Platelet-Rich Plasma With Dimethyl Sulfoxide and Trehalose. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.72, p. 112-116, 2019.
- LIMA, M. S; PASCOAL, A. R; STILWALL, T. G.. Glycemia as a sign of the viability of the foetuses in the last days of gestation in Dairy goats with pregnancy toxemia. **Irish Veterinary Journal**, v.65, n.1, p.1, 2012.
- MIRANDA, S; COSTA, M. F. M.; REBOUÇAS, N. RAMOS, M.T; LESSA, D. A. B; ALENCAR, N. X; Protocolos para preparação de plasma rico em plaquetas (PRP) em cavalos Quarto de milha. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, n.8, p. 614-621, 2019.
- PACHITO, D. V; BAGATTINI, A. M; JÚNIOR, M. A; RIERA, R. Práticas de produção, armazenamento e utilização do plasma rico em plaquetas e produtos relacionados no Brasil: estudo transversal. **Revista visa em debate**, v.9, n.2, p.48-58, 2021.
- PEREIRA, R. C. F., ZACARIAS G.V. F., CANTARELLI, C. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. **Ciência Rural**, v.43, 339 p. 1122-1127, 2013.
- ROMANO, J. E. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, v.55, n.1-3, p.1519, 2004.
- SALES, A. A. S. O complexo do agronegócio do cavalo: uma análise sistêmica da equinocultura e tendências de mercado. **Monografia** (Bacharelado em Gestão do Agronegócio) – Universidade de Brasília, 2018.
- YAN, B; ZHANG, Y; TIAN, S; HU, R; WU, B; Effect of autologous platelet-rich plasma on human sperm quality during cryopreservation. **Elsevier, cryobiology**, v.98, p.12-16. 2021.
- YEAMAN, M.R; YOUNT, N.Y; WARING, A.J; GANK, K.D; KUPFERWASSER, D; WIESE, R; BAYER, A.S; WELCH, W. H. Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1768, n. 3, p. 609–619, 2006.
- MAIA, L; SOUZA, M. V; ALVES, G. E. S; JÚNIOR, RIBEIRO, J. I; OLIVEIRA, A. C; ZANDIL, B. M; SILVA, Y.F.R.S. Plasma Rico em Plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: Avaliação Ultrassonográfica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 241-245. 2009.

MARX R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, n.4, p. 489-96. 2004.

MOLLOY, T; WANG Y; MURRELL G. A. C. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. **Sports Med**, v.33, p.381-394. 2003.

MOTA, M. L; BARRETO, B. R; LEITE, B. R; CAVALCANTE, B. C. C. D. Desenvolvimento de um dispositivo para obter plasma rico em plaquetas (PRP). **Revista Brasileira de Ortopedia**, vol.57, n.2, p.289-294. 2022.

MUTHU, S. A. B.C; KRISHNAN, A.B.D; RAMANATHAN, K. R; Standardization and validation of a conventional high yield platelet-rich plasma preparation protocol. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 82, 2022.

NEWCOMBE, J. R. Human chorionic gonadotropin. **Equine Reproduction**. 2<sup>a</sup> Ed. Wiley-Blackwell, p.1858-1869, 2011.

SAMPER, J. C; JENSEN, S; SERGENAT, J. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. **Journal Equine Veterinary Science**, v.22, p.320-323, 2002

SCHNABEL, L. V; MOHAMMED, O. H; MILLER, B. J; McDERMOTT, W. G; JACOBSON, M. S; SANTANGELO, K. S; FORTIER, A. L. Platelet Rich Plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research, Hoboken**, v.25, n.2, p.230-240, 2007.

SOUSA, D.B; BICUDO, S. D; AZEVEDO, H. C; MAIA, M. S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Vet Zootec**, v.20, p.649-657, 2012.

SEGABINAZZI, L. G. T. M; PODICO, G; FOSSER, M. F; NANJAPPA, C. G; ALVARENGA, E. A; CANISSO, I. F; **Three Manual Noncommercial Methods to Prepare EquiPlatelet-Rich Plasma**. *Animals*, v.11, n.1478, p. 1-16, 2021.

SEIDEL, S. R. T; VENDRUSCULO, C. P; MOREIRA, J. J; FULBER, J; OTTAIANO, T. E; OLIVA, M. L. V; MICHELACCI, Y. M; BACCARDIN, R. Y.A; Does Double Centrifugation Lead to Premature Platelet Aggregation and Decreased TGF- $\alpha$  Concentrations in Equine Platelet-Rich Plasma? **Veterinary sciences**, v.6, n. 68, p. 1-12. 2019.

SUTER, W. W; KANEPS, A. J; BERTONE, A. L. Comparação de valores hematológicos e concentrações de fator de crescimento transformante- $\beta$  e fator de crescimento semelhante à insulina em concentrados de plaquetas obtidos por meio de métodos de buffy coat e aférese de sangue equino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.65, p. 924–930. 2004

STRELIN® (2021). Botupharma. Disponível em: <https://botupharma.com/produto/strelin/>.  
Data de consulta: (18/02/2024)

TASKER, S; CRIPPS, P; MACKIN, A. Avaliação de métodos de contagem de plaquetas em gatos. **Regeneração e reparação de feridas**. v.27, n.3, p.268-276. 2001

WILSON, C. G; DOWNIE, C. R; HUGHES, J. P; ROSER, J. F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Journal Equine Veterinary Science**, v.10, p.301-308, 1990.

## 5. ANEXOS

### - Comprovante Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO

Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

Recife, 20 de junho de 2022  
CEUA N 1747200622

#### COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 361.157.034-68

Título da proposta: Avaliação de 4 protocolos para obtenção do plasma rico em plaquetas na espécie equina

Responsável: Gustavo Carneiro Ferrer

Equipe: Diogo Gutemberg Nascimento Bezerra, Eliana Nunes Pereira, Elizabeta Amorim Santos, Gilvannya Gonçalves de Sobral, Giovanna Isabella de Souza Couto, Leonardo Silvestre de Andrade

Telefone: 81999746663 e-mail: camelrogustavo1@gmail.com

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema ([\\*http://ww2.ceua.ufrpe.br\\*](http://ww2.ceua.ufrpe.br)) por meio da sua senha de acesso.



UNIVERSIDADE